

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/485 (2019.02); A61P 35/00 (2019.02)

(21) (22) Заявка: 2015152785, 12.05.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.05.2014Дата регистрации:
25.04.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
10.05.2013 GB 1308440.5

(43) Дата публикации заявки: 16.06.2017 Бюл. № 17

(45) Опубликовано: 25.04.2019 Бюл. № 12

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 10.12.2015

(86) Заявка РСТ:
GB 2014/051439 (12.05.2014)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/181131 (13.11.2014)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ДАЛГЛЕЙШ Ангус (GB),
АЛЛЕН Рэчел (GB)

(73) Патентообладатель(и):

КЭНСЕР ВЭКСИН ИНСТИТЮТ (GB)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2011136845 A1, 09.06.2011. US 6288074 B1, 11.09.2001. US 6384044 B1, 07.05.2002. ИСАЕНКО Е.Ю. и др. "Адьюванты в современной вакцинологии". Annals of Mechnikov Institute, 2013, no. 4, с.5-21, см. Таблица на стр. 14, найдено 06.02.2018 из Интернет: http://www.imiamn.org.ua/jornal/4_2013/PDF/3.pdf. Н.В.Медуницын "Вакцинология", М., "Триада-Х", (см. прод.)

(54) ЛЕЧЕНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ НАЛТРЕКСОНОМ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к онкологии, и касается лечения меланомы или рака предстательной железы. Для этого определяют уровень TLR9 и больным со сверхэкспрессией TLR9 вводят эффективное количество композиции, содержащей налтрексон,

налксон или метилналтрексон. Это обеспечивает эффективное лечение данной группы больных за счет антагонистического действия налтрексона на TLR9 и снижения тем самым продукции воспалительных цитокинов. 3 н. и 10 з.п. ф-лы, 2 ил., 3 пр.

(56) (продолжение):
2010, с.389-391.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(19) **RU** (11)

2 686 325⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 31/485 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC

A61K 31/485 (2019.02); *A61P 35/00* (2019.02)

(21) (22) Application: **2015152785, 12.05.2014**

(24) Effective date for property rights:
12.05.2014

Registration date:
25.04.2019

Priority:

(30) Convention priority:
10.05.2013 GB 1308440.5

(43) Application published: **16.06.2017 Bull. № 17**

(45) Date of publication: **25.04.2019 Bull. № 12**

(85) Commencement of national phase: **10.12.2015**

(86) PCT application:
GB 2014/051439 (12.05.2014)

(87) PCT publication:
WO 2014/181131 (13.11.2014)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**DALGLEJSH Angus (GB),
ALLEN Rechel (GB)**

(73) Proprietor(s):

KENSER VEKSIN INSTITYUT (GB)

(54) **TREATMENT OF MALIGNANT TUMOUR WITH NALTREXONE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to oncology, and concerns treatment of melanoma or prostate cancer. To this end, the level of TLR9 is determined and an effective amount of a composition containing naltrexone, naloxone or methylnaltrexone is administered to patients with overexpression of

TLR9.

EFFECT: this provides effective treatment of the given group of patients due to the antagonistic effect of naltrexone on TLR9 and thereby reducing the production of inflammatory cytokines.

13 cl, 2 dwg, 3 ex

R U 2 6 8 6 3 2 5 C 2

R U 2 6 8 6 3 2 5 C 2

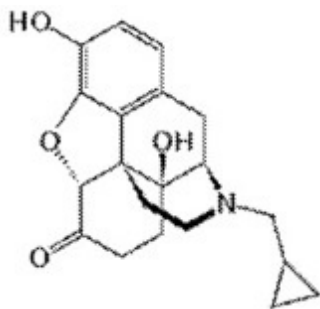
Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к лечению и симптоматической терапии индивидуума с нарушением, характеризуемым аномальной активностью врожденной иммунной системы, в особенности, определенных форм злокачественных опухолей.

Уровень техники

Налтрексон представляет собой перорально вводимый антагонист опиоидных рецепторов с химическим наименованием морфинан-6-он,17-(циклопропилметил)-4,5-эпокси-3,14-дигидрокси-(5 α).

Молекулярная формула налтрексона представляет собой C₂₀H₂₃NO₄, а его молекулярная масса составляет 341,41 в безводной форме (максимальное содержание воды <1%). Химическая структура налтрексона представлена ниже.



Налтрексон широко используют в качестве лечения опиатной зависимости. Однако некоторые пациенты используют налтрексон в низких дозах (LDN) в качестве недокументированного лечения ряда иммунозависимых патологических состояний и злокачественных опухолей. Существуют предварительные свидетельства, что LDN могут быть эффективны при рассеянном склерозе (Rahn et al. 2011), болезни крона (Smith et al. 2011) и определенных злокачественных опухолях.

В отношении злокачественных опухолей Zagon и McLaughlin (1983) и Hytrek et al. (1996) сообщили об опосредованном LDN ингибировании роста клеток нейробластомы мышей и рака толстого кишечника человека, соответственно, при оценке в моделях ксенотрансплантатов у мышей. Кроме того, выявлено, что комбинации LDN с дополнительными терапевтическими средствами эффективны в отношении роста и прогрессирования определенных типов злокачественных опухолей, например, Donahue et al. (2011a) сообщили о мощном антипролиферативном действии LDN и цисплатина на злокачественные клетки яичника человека *in vitro* и в моделях ксенотрансплантатов у мышей *in vivo*. В клинике, Berkson et al. (2006) описали длительное выживание пациента с раком поджелудочной железы с метастазами в печень после лечения α -липоевой кислотой в комбинации с LDN; после этого авторы опубликовали сходные наблюдения у трех дополнительных пациентов с метастатическим раком поджелудочной железы (Berkson et al. 2009).

Роль LDN в приведенных выше наблюдениях до настоящего времени в основном объясняли на основе антагонистического действия LDN на рецептор опиоидного фактора роста (OGFr). OGFr распознает опиоидный фактор роста (OGF, также обозначаемый как [Met⁵]-энкефалин), и, по-видимому, периодические дозы налтрексона обеспечивают временную блокаду, которая инициирует повышение экспрессии рецептора (Hytrek et al. 1996). Выявлено, что это повышение экспрессии OGFr приводит к сниженной пролиферации *in vitro* клеток, характерных для рака поджелудочной железы, колоректального рака и плоскоклеточной карциномы (Donahue et al. 2011b).

Однако в исследованиях Hutchinson et al. (2008), где показано, что в дополнение к

его действию на OGF α , налтрексон может являться слабым антагонистом TLR4, представителем семейства Toll-подобных рецепторов (TLR), для LDN выявлен потенциальный механизм в качестве прямого иммуномодулятора. Распознающие структуры рецепторы, такие как TLR, позволяют клеткам иммунной системы выявлять присутствие патогенов или внутренних сигналов об опасности, и отдают им команду запускать иммунный ответ. Активация врожденного иммунитета представляет собой необходимый этап для вызова последующего адаптивного иммунного ответа, и, учитывая большой воспалительный потенциал TLR, их активность необходимо строго контролировать. Как правило, стимуляция TLR приводит к индукции механизмов обратной связи, но когда этого не происходит, повышенная активность TLR может приводить к неадекватному иммунному ответу, истощению иммунной системы и/или аутоиммунитету.

Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения выявили, что налтрексон также действует в качестве антагониста рецептора врожденной иммунной системы TLR9. Это наблюдение имеет глубокие последствия для использования LDN в качестве иммуномодулятора и позволило авторам настоящего изобретения определить ряд новых терапевтических применений, в частности в области лечения и симптоматической терапии злокачественных опухолей.

По первому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей налтрексон, для применения в лечение индивидуума с нарушением, которое характеризуется сверхэкспрессией TLR9 и/или повышенной активностью опосредованной TLR9 передачи сигналов.

По второму аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей налтрексон, для применения в симптоматической терапии индивидуума с опухолью/злокачественной опухолью.

По третьему аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума с нарушением, которое характеризуется сверхэкспрессией TLR9 и/или повышенной активностью опосредованной TLR9 передачи сигналов; где способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей налтрексон.

По четвертому аспекту настоящее изобретение относится к способу обеспечения симптоматической терапии индивидууму с опухолью/злокачественной опухолью, включающему введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей налтрексон.

Краткое описание чертежей

Изобретение описано со ссылкой на сопровождающие фигуры, где;

На фигуре 1 представлен антагонизм TLR9 посредством налтрексона. Образцы и контроли тестировали в двух повторениях на рекомбинантной линии клеток HEK-293, экспрессирующих различные рецепторы TLR и NOD с репортерным геном щелочной фосфатазы. Клетки инкубировали с 1 мкМ налтрексоном или без в анализе антагонизма с использованием панели Invivogen передающих сигналы трансфектантов TLR и NOD. Представлены результаты для TLR4 и TLR9, результаты активации TLR приведены в виде значений оптической плотности (ОП), которые подтверждены в трех независимых экспериментах.

На фигуре 2 представлена способность налтрексона, разбавленного в фосфатно-солевом буфере (PBS) или H₂O, в различных концентрациях ингибировать TLR9 в трансфицированной TLR9 линии клеток (как описано выше).

Подробное описание изобретения

Открытие авторами настоящего изобретения того, что налтрексон действует в качестве антагониста TLR9, позволяет определить новые терапевтические применения LDN, в частности в области лечения и симптоматической терапии злокачественных опухолей.

5 Определенные распознающие структуры рецепторы, такие как TLR4, расположены на клеточной поверхности, тогда как другие, такие как TLR7, TLR8 и TLR9, находятся внутри клетки. Так как налтрексон может проникать в клетки посредством пассивной диффузии (Cheng et al. 2009), авторы настоящего изобретения попытались определить может ли он в дополнение к белку клеточной поверхности TLR4 действовать в качестве антагониста для любого внутриклеточного TLR. Наблюдали выраженное антагонистическое действие на TLR9, у которого LDN ингибировал распознавание CpG ДНК (фигура 1), а последующее титрование выявило IC₅₀ приблизительно 50 мкМ (фигура 2). Кроме того, было воспроизведено умеренное антагонистическое действие на TLR4, наблюдаемое Hutchinsson et al. (2008).

15 TLR9 представляет собой рецептор врожденной иммунной системы, который после выявления неметиловой CpG ДНК вызывает продукцию интерферонов типа 1 и других воспалительных цитокинов (TNF α , IL-2, IL-6). Характер ответа, развивающегося после активации TLR9, может варьировать в соответствии с внутриклеточным положением, где рецептор взаимодействует с его лигандами, в соответствии с тем, действует ли в качестве корецептора CD14, в соответствии с последовательностью CpG ДНК-лиганда и с типом затрагиваемых клеток (Weber et al. 2012). Форма введения (местно по сравнению с системным) CpG ДНК также может определить, является ли конечный результат передачи сигнала TLR9 воспалительным или ингибирующим (Wingender et al. 2006).

25 TLR9 экспрессирован в макрофагах, В-клетках и дендритных клетках, и в частности в субпопуляции плазматоидных дендритных клеток (pDC). pDC специализируются на быстрой продукции воспалительных цитокинов, известных как интерфероны типа I (IFN-I), после инфекции и действуют в качестве центральных регуляторов воспаления и Т-клеточного ответа, а также в модуляции других функций клеток врожденного иммунитета (Takagi et al. 2011). Интерфероны типа 1, продуцируемые pDC, обеспечивают уничтожение внутриклеточных инфекций и обладают мощным действием на другие иммунные клетки, опосредуя созревание DC, активацию моноцитов и клеток естественных киллеров, усиление адаптивного иммунного ответа и способность отвечать на другие стимулы TLR. Таким образом, иммуномодулирующие функции налтрексона в низких дозах, опосредуемые антагонизмом TLR9 преимущественно воздействуют на функцию pDC, хотя нисходящее действие после модуляции pDC может проявляться у широкого спектра клеток.

30 Ролью TLR9 в природе является стимуляция иммунного ответа. То, что антагонизм TLR9 может представлять собой эффективное лечение или симптоматическую терапию индивидуума с диагнозом злокачественной опухоли, учитывая, что целесообразным мог бы являться эффективный противоопухолевый иммунный ответ или агонизм иммунной системе, может выглядеть противоречащим здравому смыслу. Однако повышенная активность TLR9 может оказывать вредоносное действие на иммунный ответ; активность pDC благоприятна при инициации иммунного ответа, но постоянная активация TLR9 может ингибировать Т- и В-клеточный ответ. Длительная активация TLR9 приводит к иммуносупрессии посредством индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), лиганда программируемой гибели клеток 1 (PDL1) и родственного с TNF индуцирующего апоптоз лиганда (TRAIL) (Boasso et al. 2011). В этом случае IDO, которую продуцируют

pDC в ответ на передачу сигнала TLR7/9, оказывает ингибирующее действие, которое предположительно приводит к иммуносупрессии и отсутствию эффективного Т-клеточного ответа. Также TLR9 вероятно может вызывать толерантность у В-клеток в присутствии апоптотических клеток.

5 Специализируясь на детекции микробной нуклеиновой кислоты, при определенных патологических состояниях TLR9 может распознавать и претерпевать активацию посредством собственной нуклеиновой кислоты. При системной красной волчанке (SLE), иммунные комплексы собственной ДНК, захваченные внеклеточными нейтрофильными ловушками, затем может распознавать TLR9 в pDC с инициацией
10 продукции IFN типа I; подобная ситуация может происходить при псориазе.

Если повышенная активность TLR9 может приводить к нарушению регуляции иммунной системы, таким образом, логично, что его антагонизм посредством LDN может снижать хронический воспалительный ответ с обеспечением (повторного) появления направленного и эффективного иммунного ответа. Например,
15 злокачественная опухоль ассоциирована с воспалением и высказано предположение, что приблизительно 25% злокачественных опухолей связаны с хроническим воспалением (Mantovani 2011). Таким образом лечение LDN может снижать воспаление с обеспечением появления эффективного противоопухолевого адаптивного иммунного ответа, в частности в злокачественных опухолях, где воспаление направляется сверхэкспрессией
20 TLR9 в злокачественной опухоли или в микроокружении.

Опосредованное LDN ингибирование TLR9 также может обеспечить запуск эффективного иммунного ответа другими представителями семейства TLR; это может найти особое применение для обеспечения симптоматической терапии пациенту, страдающему любым типом злокачественных опухолей. Приблизительно 89% случаев
25 злокачественных опухолей в Великобритании диагностируют у людей старше 50 (Cancer Research UK), таким образом, комбинация злокачественной опухоли и связанного с возрастом ослабления иммунной системы ("старение" иммунной системы) у пациента может приводить к значительному дисбалансу иммунной системы. Модуляция подмножества рецепторов, таких как TLR4 и TLR9, посредством налтрексона с
30 одновременным обеспечением стимуляции других представителей семейства TLR или стимуляции иммунной системы другим путем, может обеспечить простое ингибирование избыточной активности иммунной системы или обеспечить менее значительное отклонение иммунного ответа. Кроме лечения это может обеспечить улучшения качества жизни тем, кто страдает злокачественной опухолью и, таким образом, может являться
35 эффективной стратегией для симптоматической терапии.

Как используют в настоящем документе, "налтрексон" относится к морфинан-6-он, 17-(циклопропилметил)-4,5-эпоксид-3,14-дигидрокси-(5 α) с указанной выше химической структурой и к его фармацевтически приемлемым солям, сольватам, гидратам, стереоизомерам, клатратам и пролекарственным средствам. Использование налоксона,
40 структурного аналога налтрексона, который по ожиданиям специалистов также действует в качестве антагониста TLR9, входит в объем изобретения и включен в термин "аналог", используемый в описании и формуле изобретения. Подобным образом, метилналтрексон также рассматривают как подходящий аналог для применения во всех аспектах изобретения. Предпочтительной формой налтрексона является форма
45 его гидрохлоридной соли.

Как используют в настоящем документе, термины "агонист" и "антагонист" имеют их общепринятые значения, как используют в данной области.

Как используют в настоящем документе, термин "сверхэкспрессия TLR9" относится

к повышенным уровням иРНК и/или белка TLR9, экспрессируемым в клетках данной ткани, в сравнении с уровнями TLR9, измеряемыми в нормальных клетках (не подверженных заболеванию) того же типа ткани в аналогичных условиях. Указанные уровни экспрессии иРНК и/или белка TLR9 можно определять рядом способов, известных в данной области, включая в качестве неограничивающих примеров количественную ПЦР-ОТ, вестерн-блоттинг, иммуногистохимию и подходящие производные указанного выше.

Как используют в настоящем документе, термин "повышенная активность опосредованной TLR9 передачи сигналов" относится к уровню активности опосредованной TLR9 передачи сигналов, включая активность ее нижерасположенных эффекторов, повышенной в сравнении с уровнем такой активности, как измеряют в том же типе ткани (не подверженной заболеванию) в аналогичных условиях. Указанная повышенная активность нижерасположенных эффекторов опосредованной TLR9 передачи сигналов не обязательно может быть вызвана повышенной экспрессией и/или активностью TLR9; нижерасположенный эффектор в иммунном каскаде/пути, опосредуемый в числе прочего TLR9, может демонстрировать повышенную активность вследствие аномальной активности другого вышерасположенного компонента каскада/пути; однако если активность указанного нижерасположенного эффектора опосредована (по меньшей мере частично) TLR9, тогда антагонизм TLR9 может изменять активность указанного нижерасположенного эффектора в направлении терапевтического действия. Таким образом, нарушения, демонстрирующие повышенную активность нижерасположенных эффекторов, как описано выше, также можно рассматривать как характеризующиеся повышенной активностью опосредованной TLR9 передачи сигналов. Нижерасположенные эффекторы опосредованной TLR9 передачи сигналов в качестве неограничивающих примеров включают клетки, в частности клетки, ассоциированные с иммунной системой, такие как В-клетки и дендритные клетки (например, плазмоцитоподобные дендритные клетки) (указанные клетки сами могут экспрессировать TLR9), где активность указанных клеток, в числе прочего, может быть опосредована TLR9; и пептиды/белки, в частности пептиды/белки, ассоциированные с иммунным ответом, такие как цитокины (например, TNF α , IL-2, IL-6) и интерфероны (например, IFN-I), где экспрессия, секреция и/или активность указанных белков, в числе прочего, может быть опосредована TLR9. Нижерасположенные эффекторы опосредованной TLR9 передачи сигналов могут присутствовать в другой ткани относительно белков TLR9, которые опосредуют их активность. Известные в данной области способы, которые можно использовать для определения уровня активности опосредованной TLR9 передачи сигналов в качестве неограничивающих примеров включают клеточные анализы, включающие анализ транскрипции и/или трансляция гена-мишени и/или белка-мишени опосредованной TLR9 передачи сигналов; клеточные анализы, включающие анализ фенотипа и активности клетки; клеточные анализы, включающие анализ фосфорилирования, протеолитического процессинга и/или иной модификации по меньшей мере одного нижерасположенного компонента опосредованной TLR9 передачи сигналов; анализ последовательностей нуклеиновых кислот генов и/или транскриптов РНК TLR9. Как правило, но не обязательно, сверхэкспрессия TLR9 приводит к повышенной активности опосредованной TLR9 передачи сигналов. Повышенная активность опосредованной TLR9 передачи сигналов необязательно может приводить к сверхэкспрессии TLR9, например, в случаях, когда ген и/или белок TLR9 содержат активирующие мутации.

Как используют в настоящем документе, термины "лечение" и "терапия" и "лечить"

относятся 1) к терапевтическим средствам, излечивающим, замедляющим и/или
останавливающим прогрессирование диагностированного патологического состояния
или нарушения, и 2) к профилактическим или предохранительным средствам, которые
предотвращают и/или замедляют развитие интересующего патологического состояния
5 или нарушения. Таким образом, индивидуумы, нуждающиеся в лечении, включают
индивидуумов с уже присутствующим нарушением; индивидуумов со склонностью к
нарушению и индивидуумов, у которых нарушение необходимо предотвратить. В
некоторых случаях индивидуума успешно "лечат" от злокачественной опухоли в
соответствии с новыми применениями по настоящему изобретению, если пациент
10 демонстрирует одно или несколько из следующего: снижение количества или полное
отсутствие злокачественных клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование или
отсутствие инфильтрации злокачественных клеток в периферические органы, включая,
например, проникновение злокачественной опухоли в мягкую ткань и кости;
ингибирование или отсутствие метастазирования опухоли; ингибирование или отсутствие
15 роста опухоли; сниженная заболеваемость и смертность; снижение туморогенности,
частоты туморогенности или туморогенной емкости опухоли; снижение количества
или частоты злокачественных стволовых клеток в опухоли; дифференцировка
опухолеобразующих клеток в неопухолеобразующее состояние или определенная
комбинация эффектов.

20 Как используют в настоящем документе "симптоматическая терапия", в рамках
лечения опухоли/злокачественной опухоли, относится к лечению, которое помогает
пациенту справляться со злокачественной опухолью и ее лечением, от предварительного
диагноза, через процесс диагноза и лечения, до излечения, продолжающегося
заболевания или гибели. Симптоматическая терапия в качестве неограничивающих
25 примеров включает, но не ограничивается этим, контроль симптомов, комплементарную
терапию, контроль побочных эффектов лечения, психологическую поддержку,
реабилитацию, самопомощь и поддержку, паллиативное лечение, лечение в конце жизни.
Таким образом, симптоматическую терапию проводят не с ожиданием излечения
рассматриваемой опухоли/злокачественной опухоли (в соответствии с указанным выше
30 определением), но для улучшения качества жизни пациента, например, посредством
ослабления симптомов.

Как используют в настоящем документе, термины "злокачественная опухоль" и
"злокачественный" относятся или описывают физиологическое состояние у
млекопитающих, у которых группа клеток характеризуется нерегулируемым клеточным
35 ростом, пролиферацией и/или сроком существования. Примеры злокачественной опухоли
в качестве неограничивающих примеров включают карциному, лимфому, бластому,
саркому, миелому и лейкоз.

Как используют в настоящем документе, термины "опухоль" или "неоплазия"
относится к любой массе ткани, которая является результатом избыточного клеточного
40 роста, пролиферации и/или срока существования, доброкачественной
(незлокачественной) или злокачественной (раковой), включая предраковые очаги.

Как используют в настоящем документе, термин "опухолеобразующий" относится
к функциональным характеристикам стволовых клеток солидных опухолей, включая
свойства самоподдержания (приводящих к образованию дополнительных
45 опухолеобразующих злокачественных стволовых клеток) и пролиферации с получением
всех других опухолевых клеток (приводящих к образованию дифференцированных и,
таким образом, неопухолеобразующих опухолевых клеток), которые позволяют
стволовым клеткам солидных опухолей формировать опухоль. Эти свойства

самоподдержания и пролиферации с получением всех других опухолевых клеток дают злокачественным стволовым клеткам способность формировать пальпируемые опухоли после серийной трансплантации хозяину с ослабленным иммунитетом (например, мыши) по сравнению с неопухолеобразующими опухолевыми клетками, которые неспособны
5 формировать опухоли после серийной трансплантации. Выявлено, что неопухолеобразующие опухолевые клетки могут формировать опухоль после первичной трансплантации хозяину с ослабленным иммунитетом после получения опухолевых клеток из солидной опухоли, но эти неопухолеобразующие опухолевые клетки не приводят к образованию опухоли после серийной трансплантации.

10 Как используют в настоящем документе, термин "микроокружение опухоли/ злокачественной опухоли" относится к незлокачественным клеткам, включая их внеклеточные характеристики, которые поддерживают рост, период существования и/ или метастазирование злокачественных клеток опухоли/злокачественной опухоли. Незлокачественные клетки, также называемые стромальными клетками, которые
15 модулируют рост или период существования опухолевых клеток, могут находиться или накапливаться в том же клеточном пространстве, что и злокачественные клетки, или в клеточном пространстве, прилегающем или близкорасположенном к злокачественным клеткам. Незлокачественные клетки опухолевого микроокружения в качестве неограничивающих примеров включают фибробласты, миофибробласты,
20 глиальные клетки, эпителиальные клетки, адипоциты, сосудистые клетки (включая кровь и эндотелиальные клетки лимфатических сосудов и перициты), резидентные и/ или привлекаемые воспалительные и иммунные клетки (например, макрофаги, дендритные клетки, миелоидные супрессорные клетки, гранулоциты, лимфоциты и т.д.), резидентные и/или привлекаемые стволовые клетки, которые способны приводить к
25 образованию или дифференцироваться в любые из указанных выше незлокачественных клеток, и любые функционально отличающиеся подтипы указанных выше клеток, как известно в данной области.

Как используют в настоящем документе, термин "индивидуум" относится к любому животному (например, млекопитающему), включая в качестве неограничивающих
30 примеров людей, не являющихся человеком приматов, псовых, кошачьих, грызунов и т.п., которые должны получать конкретное лечение. Как правило, в настоящем документе термины "индивидуум" и "пациент" по отношению к человеку используют взаимозаменяемо.

Как используют в настоящем документе, термин "иммуномодулятор" относится к
35 средству, чье действие на иммунную систему приводит к немедленному или задержанному повышению или снижению активности по меньшей мере одного пути, вовлеченного в иммунный ответ. Указанный ответ может быть природным или запускаемым искусственно как часть врожденной или адаптивной иммунной системы или обеих.

40 В одном из вариантов осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению используют для модуляции иммунного ответа для лечения индивидуума с нарушением, характеризуемым сверхэкспрессией TLR9 и/или повышенной активностью опосредованной TLR9 передачи сигналов. Указанные выше характеристики известны специалисту как характеристики нарушения, подлежащего лечению. Нарушения,
45 характеризуемые сверхэкспрессией TLR9 и/или повышенной активностью опосредованной TLR9 передачи сигналов в качестве неограничивающих примеров включают болезнь Крона, системную красную волчанку, псориаз, определенные злокачественные опухоли. Индивидуума, подлежащего лечению, самого можно

охарактеризовать, как обладающего сверхэкспрессией TLR9 и/или гиперактивностью опосредованной TLR9 передачи сигналов. Индивидуума можно охарактеризовать таким образом посредством диагностического теста с определением уровня экспрессии TLR9 и/или опосредованной TLR9 передачи сигналов (в частности в клетках, патологически ассоциированных с указанным нарушением), относительно уровней в том же типе ткани (когда она не подвержена заболеванию) в аналогичных условиях. Способы, известные в данной области, которые можно использовать для определения уровня экспрессии TLR9 и/или опосредованной TLR9 передачи сигналов, в качестве неограничивающих примеров включают способы, указанные выше. Предпочтительно, указанное нарушение представляет собой опухоль/злокачественную опухоль. Более предпочтительно, опухоль/злокачественная опухоль и/или ее микроокружение характеризуют, как обладающие сверхэкспрессией TLR9 и/или гиперактивностью опосредованной TLR9 передачи сигналов; такие опухоли/злокачественные опухоли в качестве неограничивающих примеров включают опухоли, выбранные из группы, состоящей из рака молочной железы, плоскоклеточной карциномы шейки матки, карциномы желудка, глиомы, печеночноклеточной карциномы, рака легких, меланомы, рака предстательной железы, рецидивирующей глиобластомы, рецидивирующей неходжкинской лимфомы, колоректального рака. Однако также предусмотрены фармацевтические композиции по изобретению, используемые при лечении индивидуумов, несущих другие опухоли/злокачественные опухоли с указанными выше характеристиками (опухоль/злокачественная опухоль и/или ее микроокружение, характеризующиеся, как обладающие сверхэкспрессией TLR9 и/или гиперактивностью опосредованной TLR9 передачи сигналов). Индивидууму в дополнение к налтрексону предпочтительно также можно вводить или необходимо вводить по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство, где средство и его доза выбраны так, чтобы уменьшить иммуносупрессию; такие средства в качестве неограничивающих примеров включают, ревлимид (предпочтительно вводимый в дозе от 5 мг до 25 мг), циклофосфамид (предпочтительно вводимый в дозе от 50 мг до 100 мг), гемцитабин (предпочтительно вводимый в дозе от 250 мг/кг до 2000 мг) или карбоплатин в дозе 4-6 площадей под кривой (AUC).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума с нарушением, характеризуем сверхэкспрессией TLR9 и/или повышенной активностью опосредованной TLR9 передачи сигналов; где способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции по изобретению. Указанный способ лечения обладает такими же необязательными и предпочтительными характеристиками, что и применение фармацевтической композиции, описанное в предшествующем разделе.

В другом варианте осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению, необязательно при введении совместно, до или после по меньшей мере одного другого иммуномодулятора, используют для модуляции иммунного ответа для обеспечения симптоматической терапии индивидууму с опухолью/злокачественной опухолью. Указанные опухоли/злокачественные опухоли не ограничены опухолями/злокачественными опухолями, обладающими сверхэкспрессией TLR9 и/или гиперактивностью опосредованной TLR9 передачи сигналов. Таким образом, примеры в качестве неограничивающих примеров включают карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз; более конкретные примеры таких опухолей/злокачественных опухолей включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легких, злокачественную

опухоль брюшины, гепатоцеллюлярный рак, желудочно-кишечный рак, рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстого кишечника, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, 5 рак почки, рак печени, рак предстательной железы, меланому, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, печеночную карциному и различные типы раков головы и шеи. Если используют, иммуномодулятор предпочтительно представляет собой иммунный агонист, т.е. средство, вызывающее и/или усиливающее иммунный ответ, например, вакцина. Более предпочтительно, иммунный агонист выбран из группы, 10 состоящей из циклофосфида; ревлимида; имихимида; цельноклеточных *Mycobacteria*, предпочтительно шероховатого штамма *Mycobacterium vaccae* или *Mycobacterium obuense* (как описано в WO 07/071978); даунорубицина; оксалиплатина; 5-фторурацил; гемцитабина; зомета. Индивидуума для проведения симптоматической терапия самого характеризовать как обладающего сверхэкспрессией TLR9 и/или гиперактивностью 15 опосредованной TLR9 передачи сигналов. Индивидуума можно охарактеризовать как такового посредством диагностического теста с определением уровня экспрессии TLR9 и/или опосредованной TLR9 передача сигналов относительно уровней в том же типе ткани (когда она не подвержена заболеванию) в аналогичных условиях. Известные в данной области способы, которые можно использовать для определения уровня 20 экспрессии TLR9 и/или опосредованной TLR9 передача сигналов в качестве неограничивающих примеров включают способы, указанные выше. Когда так характеризуют индивидуума; наличием сверхэкспрессии TLR9 предпочтительно характеризуются клетки иммунной системы, в которых TLR9 экспрессируется исходно. Такие клетки в качестве неограничивающих примеров включают макрофаги; В-клетки 25 и дендритные клетки, в частности, плазматоцитидные дендритные клетки. Также, когда так характеризуют индивидуума; опухоль/злокачественную опухоль и/или ее микроокружение можно идентифицировать, как обладающие сверхэкспрессией TLR9 и/или гиперактивностью опосредованной TLR9 передачи сигналов.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу 30 обеспечения симптоматической терапии индивидууму со злокачественной опухолью. Указанный способ обеспечения симптоматической терапии включает те же необязательные и предпочтительные характеристики, как применение фармацевтической композиции, описанное в предыдущем разделе.

По вариантам осуществления, описанным выше, налтрексон в качестве части 35 фармацевтической композиции предпочтительно вводят индивидууму в дозе от 0,01 мг/кг до 0,08 мг/кг, более предпочтительно от 0,03 мг/кг до 0,06 мг/кг, наиболее предпочтительно от 0,04 мг/кг до 0,05 мг/кг. Композицию можно вводить любым общепринятым способом. Введение может быть пероральным или парентеральным введением, предпочтительно пероральным введением. Однако также предусмотрены 40 другие пути введения.

Также предоставлено, что налтрексон, предпочтительно налтрексон в низкой дозе (включая его фармацевтически приемлемые соли, сольваты, гидраты, стереоизомеры, клатраты, пролекарственные средства и их аналоги), пригоден для использования в качестве адъюванта вакцин. Налтрексон можно вводить одновременно, отдельно или 45 последовательно с иммуногеном. Для примеров налтрексон можно вводить до или после введения иммуногена (вакцины). В этом аспекте, полагают, что налтрексон стимулирует активацию цитотоксических Т-клеток посредством стимуляции дендритных клеток. Соответственно, налтрексон можно использовать, таким образом, в этом

контексте для помощи в активации иммунного ответа на различные нарушения, включая злокачественную опухоль, например, метастатическую меланому.

Таким образом, предусмотрены вакцинные композиции, содержащие налтрексон и иммуноген.

5 Изобретение далее проиллюстрировано приведенными ниже неограничивающими примерами.

Примеры

Пример 1 - Идентификация налтрексона в качестве антагониста TLR9

10 Налтрексон в низкой дозе (LDN) тестировали в анализах агонистов и антагонистов в панели трансфектантов TLR и NOD (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, NOD1, NOD2). Скрининговые анализы проводили посредством Cayla-Invivogen (Toulouse, France). В анализах агонистов, LDN не стимулировал передачу сигнала через любые из тестируемых рецепторов. В анализах антагонистов повторили слабое антагонистическое действие на TLR4, наблюдаемое Hutchinson et al. (2008), но наблюдали более выраженное действие на TLR9, у которого LDN ингибировал распознавание CpG ДНК (фигура 1).
15 Последующее титрование выявило IC₅₀ приблизительно 50 мкМ (фигура 2).

Пример 2 - LDN при лечении меланомы

20 Пациент с устойчивой к химиотерапии метастатической меланомой продемонстрировал выраженный клинический ответ на LDN в комбинации с витамином D3, который сохранялся в течение девяти месяцев.

Пациент страдал рецидивирующей меланомой головы и шеи и его ранее лечили вакциной и лучевой терапией, но это лечение потерпело неудачу и развилось новое метастатическое заболевание в грудной клетке.

25 Налтрексон в низкой дозе вводили в качестве поддерживающего лечения до большинства сеансов лучевой терапии. В пределах 48 часов у пациента развилось выраженное витилиго, которое является признаком активированных эффективных цитотоксических Т-клеток к антигенам, ассоциированным с меланомой. Это позволило заключить, что налтрексон активировал вакцину. У пациента наблюдали реакцию на лучевую терапию очагов грудной клетки.

30 Пример 3 - LDN при лечении рака предстательной железы

Пациент с устойчивым к гормонам раком предстательной железы и выраженной лимфаденопатией, которого лечили *Mycobacterium vaccae* (стимулирующая TLR2 вакцина), продемонстрировал выраженный ответ при добавлении LDN, включая снижение уровней специфического антигена предстательной железы.

35 ССЫЛКИ

Boasso, A., C. M. Royle, S. Doumazos, V. N. Aquino, M. Biasin, L. Piacentini, B. Tavano, D. Fuchs, F. Mazzotta, and S. L. Caputo. 2011. Overactivation of plasmacytoid dendritic cells inhibits antiviral T-cell responses: a model for HIV immunopathogenesis. *Blood* 118:5152-5162.

40 Berkson, B. M., D. M. Rubin, and A. J. Berkson. 2006. The long-term survival of a patient with pancreatic cancer with metastases to the liver after treatment with the intravenous alpha-lipoic acid/low-dose naltrexone protocol. *Integr. Cancer. Ther.* 5:83-89.

Berkson, B. M., D. M. Rubin, and A. J. Berkson. 2009. Revisiting the ALA/N (alpha-lipoic acid/low-dose naltrexone) protocol for people with metastatic and nonmetastatic pancreatic cancer: a report of 3 new cases. *Integr. Cancer. Ther.* 8:416-422.

45 Donahue, R. N., P. J. McLaughlin, and I. S. Zagon. 2011a. Low-dose naltrexone suppresses ovarian cancer and exhibits enhanced inhibition in combination with cisplatin. *Experimental Biology and Medicine* 236:883-895

Donahue, R. N., P. J. McLaughlin, and I. S. Zagon. 2011b. Low-dose naltrexone targets the

opioid growth factor-opioid growth factor receptor pathway to inhibit cell proliferation: mechanistic evidence from a tissue culture model. *Experimental Biology and Medicine* 236:1036-1050.

Hutchinson, M. R., Y. Zhang, K. Brown, B. D. Coats, M. Shridhar, P. W. Sholar, S. J. Patel, N. Y. Crysdale, J. A. Harrison, S. F. Maier, K. C. Rice, and L. R. Watkins. 2008. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *Eur. J. Neurosci.* 28:20-29.

Hytrek, S. D., P. J. McLaughlin, C. M. Lang, and I. S. Zagon. 1996. Inhibition of human colon cancer by intermittent opioid receptor blockade with naltrexone. *Cancer letters* 101:159-164.

Mantovani, A. 2008. Cancer: inflaming metastasis. *Nature* 457:36-37.

Rahn, K. A., P. J. McLaughlin, and I. S. Zagon. 2011. Prevention and diminished expression of experimental autoimmune encephalomyelitis by low dose naltrexone (LDN) or opioid growth factor (OGF) for an extended period: therapeutic implications for multiple sclerosis. *Brain research.*

Smith, J. P., S. I. Bingaman, F. Ruggiero, D. T. Mauger, A. Mukherjee, C. O. McGovern, and I. S. Zagon. 2011. Therapy with the opioid antagonist naltrexone promotes mucosal healing in active Crohn's disease: a randomized placebo-controlled trial. *Dig. Dis. Sci.* 56:2088-2097.

Takagi, H., T. Fukaya, K. Eizumi, Y. Sato, K. Sato, A. Shibasaki, H. Otsuka, A. Hijikata, T. Watanabe, and O. Ohara. 2011. Plasmacytoid Dendritic Cells Are Crucial for the Initiation of Inflammation and T Cell Immunity In Vivo. *Immunity* 35:958-971.

Weber, C., C. Mailer, A. Podszuweit, C. Montino, J. Vollmer, and A. Forsbach. 2012. TLR3 immune modulation by unformulated siRNA or DNA and the role of CD14 (in TLR mediated effects). *Immunology.*

Wingender, G., N. Garbi, B. Schumak, F. Jangerkes, E. Endl, D. von Bubnoff, J. Steitz, J. Striegler, G. Moldenhauer, and T. TÅting. 2006. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *European journal of immunology* 36:12-20.

Zagon, I. S., and P. J. McLaughlin. 1983. Naltrexone modulates tumour response in mice with neuroblastoma. *Science* 221:671.

(57) Формула изобретения

1. Способ лечения индивидуума с нарушением, которое характеризуется
сверхэкспрессией TLR9 и/или повышенной активностью опосредованной TLR9 передачи
сигналов; где способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции,
содержащей налтрексон, налоксон или метилналтрексон, где нарушение представляет
собой опухоль/злокачественную опухоль, выбранную из меланомы или рака
предстательной железы,

где налтрексон, налоксон или метилналтрексон как часть указанной композиции
необходимо вводить индивидууму в дозе от 0,01 мг/кг до 0,08 мг/кг, предпочтительно
от 0,03 мг/кг до 0,06 мг/кг, более предпочтительно от 0,04 мг/кг до 0,05 мг/кг,

где индивидууму вводят или вводили по меньшей мере одно химиотерапевтическое
средство.

2. Способ по п. 1, где индивидуума характеризуют как обладающего сверхэкспрессией
TLR9 и/или гиперактивностью опосредованной TLR9 передачи сигналов.

3. Способ по п. 2, где способ дополнительно включает тестирование индивидуума
на сверхэкспрессию TLR9 и/или гиперактивность опосредованной TLR9 передачи
сигналов.

4. Способ по п. 1, где индивидууму вводят или вводили по меньшей мере одно
химиотерапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из ревлимида,
циклофосфамида, гемцитабина и карбоплатина.

5. Способ по п. 4, где ревлимид вводят в дозе от 5 мг до 25 мг, циклофосфамид вводят

в дозе от 50 мг до 100 мг, и/или гемцитабин вводят в дозе от 250 мг до 2000 мг.

6. Способ обеспечения симптоматической терапии индивидууму с опухолью/ злокачественной опухолью, выбранной из меланомы или рака предстательной железы, включающий введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей
5 налтрексон, налоксон или метилналтрексон, где налтрексон, налоксон или метилналтрексон как часть указанной композиции необходимо вводить индивидууму в дозе от 0,01 мг/кг до 0,08 мг/кг, предпочтительно от 0,03 мг/кг до 0,06 мг/кг, более предпочтительно от 0,04 мг/кг до 0,05 мг/кг,

где индивидууму вводят или вводили по меньшей мере одно химиотерапевтическое
10 средство.

7. Способ по п. 6, где индивидуума характеризуют как обладающего сверхэкспрессией TLR9 и/или гиперактивностью опосредованной TLR9 передачи сигналов.

8. Способ по п. 7, где макрофаги, В-клетки и/или дендритные клетки, предпочтительно плазмоцитойдные дендритные клетки, индивидуума характеризуются как обладающие
15 сверхэкспрессией TLR9.

9. Способ по любому из пп. 6-8, где указанному индивидууму вводят или вводили по меньшей мере один другой иммуномодулятор, предпочтительно иммунный агонист.

10. Способ по п. 9, где иммунный агонист выбран из группы, состоящей из циклофосфамида, ревлимида, имихимода, цельноклеточных *Mycobacteria*, даунорубицина,
20 оксалиплатина, 5-фторурацила, гемцитабина, зометы.

11. Способ по п. 10, где цельноклеточные *Mycobacteria* представляют собой шероховатый штамм *Mycobacteria obuense* или *Mycobacteria vaccae*.

12. Применение налтрексона, налоксона или метилналтрексона в лечении метастатической меланомы, где налтрексон, налоксон или метилналтрексон необходимо
25 вводить индивидууму в дозе от 0,01 мг/кг до 0,08 мг/кг, предпочтительно от 0,03 мг/кг до 0,06 мг/кг, более предпочтительно от 0,04 мг/кг до 0,05 мг/кг, где индивидууму вводят или вводили по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство.

13. Применение по п. 12 в комбинации с витамином D3.

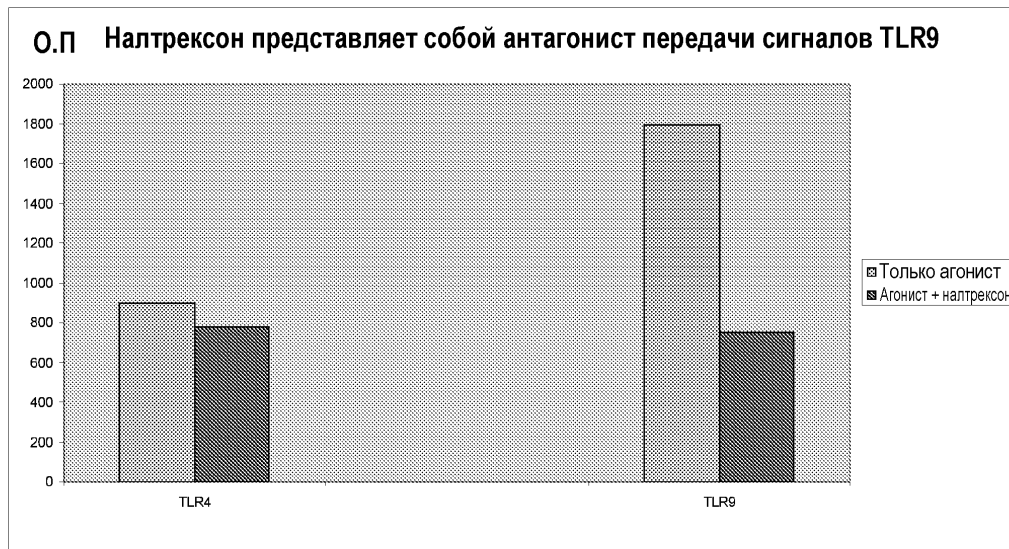
30

35

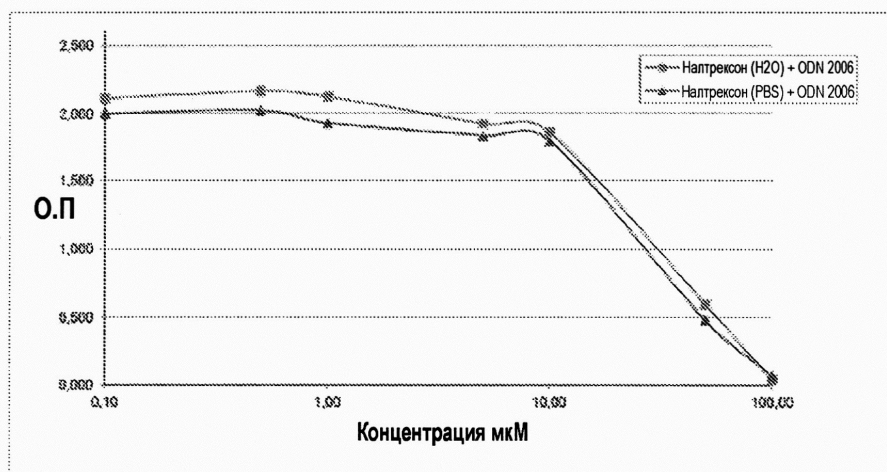
40

45

ФИГ. 1



ФИГ. 2



концентрация	100,00	50,00	10,00	5,00	1	0,50	0,10	0,05
Налтрексон (H2O) + ODN 2006	0,044	0,500	1,862	1,937	2,126	2,168	2,115	2,073
Налтрексон (PBS) + ODN 2006	0,079	0,483	1,798	1,839	1,933	2,026	2,064	1,912